323—330

23561(22)

动 物 学 研 究 1996, 17 (3): 323—330 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research

源真核生物贾第虫与原细菌着丝粒/动粒蛋白的免疫印迹检查

吴传芬[1] 李靖炎[2] 代嘉陵[3] 卢思奇[3] 王永潮[1]

(1 北京师范大学生物系 100875)

(2 中国科学院昆明动物研究所细胞与分子进化开放研究实验室 昆明 650223)

(3 首都医科大学寄生虫学教研室 北京 100054)

Q959.112

摘要 以抗人着丝粒蛋白 B 的单抗和多抗以及抗 CHO 细胞动粒蛋白的单抗对源真核生物(archezoa)蓝氏贾第虫(*Giardia lamblia*)和分别代表原细菌的 3 个枝的 3 种原细菌(*Halobacterium*、*Thermoplasma*、*Sulfosphaerellus*)作了免疫电泳检查,并以小眼虫和大肠杆菌作为对照。结果表明,3 种原细菌都呈阳性反应;而且贾第虫的反应情况显然比纤毛虫、眼虫、典型涡鞭毛虫、尖尾虫(*Oxyrrhis*)等单细胞后真核生物的更接近于原细菌的情况。这不仅从一个新的方面为真核细胞起源于古代的原细菌的学说提供了新的佐证,而且从着丝粒/动粒蛋白方面证明了源真核生物贾第虫的原始性。本工作还为认识着丝粒蛋白 B 和动粒蛋白的起源和演化提供了线索。

关键词 着丝粒/动粒蛋白的起源和演化,贾第虫,原细菌,免疫印迹

著名的进化生物学家迈尔(Ernst Mayr)在其名著《生物哲学》一书中曾反复强调哲学家和科学家 Max Delbruck 的一句话:每一个生物有机体都携带有它们祖先在过去 30 多亿年中所获得的信息(Mayr, 1992),现存的一切生命结构形式及其活动机理都是生命在几十亿年的发展过程中所获得的全部信息的具体体现。真核细胞及其各种结构和生命活动也不例外,都各有其起源和进化的历史。着丝粒是真核生物染色体上一个特化的区域,在有丝分裂过程中它支配着染色体的分离与分配。为了能更深刻地认识真核生物的着丝粒结构、组成和功能,从起源和进化的角度来考察着丝粒是十分必要的。这里我们以高等生物的着丝粒蛋白抗体为探针,对已知的最原始的真核生物和原核生物作检查,以期寻找着丝粒蛋白起源与进化的线索。

源真核生物(Archezoa)是近年来在原生生物中发现的一个极为特殊的类群。它们还没有获得线粒体和典型的高尔基氏器。核糖体仍还与原核生物的相似,是 70S 型(Cavalier-Smith, 1987, 1989; Adam, 1991),是目前所知的最原始的真核生物类群。目前已知的源真核生物有微孢子虫类、原变形虫类(archamoebae,包括多核巨变形虫

吴传芬现在地址:美国 Texas 大学,M D Anderson Cancer Center,分子遗传学系,Houston, Texas 77030
(2) 通信作者

本文 1995 年 7 月 29 日收到,同年 11 月 28 日修回

Pelomyxa 等）及双滴虫类（diplomonads，包括贾第虫等）。在此基础上，Cavalier-Smith（1989）提出了生物的八界分类系统，把真核生物划分为源真核生物和后真核生物（Metakaryota）两个超界，后者包括从一般原生生物起的所有典型真核生物。

我们已利用免疫印迹技术对原生动物纤毛虫、眼虫、尖尾虫（*Oxyrrhis*）和典型涡鞭毛虫的着丝粒／动粒蛋白进行了检查（吴传芬等，1996a，1996b）。本文所报道的工作是以蓝氏贾第虫（*Giardia lamblia*）作为源真核生物的代表进行同样的检查，并与三大枝原细菌（archaebacteria）的代表进行比较。目前已有相当充分的多方面的证据表明真核生物是起源于古代的某种原细菌（李靖炎，1989）。国际上对于源真核生物和原细菌的有关蛋白迄今尚无任何报道。本工作表明 3 种原细菌都已经有了有关的蛋白，而且与其他原生生物相比，贾第虫的着丝粒／动粒蛋白是最接近于原细菌的有关蛋白的。

蓝氏贾第虫生活在人的肠道中，象所有的双滴虫类一样，身体两侧对称，有 8 根鞭毛与左右两个彼此相同的细胞核。蓝氏贾第虫的核很小，长约 1 μm，宽约 0.7—0.9 μm，厚 0.3—0.5 μm。

1 材料与方法

本工作所用的蓝氏贾第虫虫种为卢思奇在国内分离并培养成功。实验所用的蓝氏贾第虫材料为首都医科大学寄生虫学教研室提供。作对照用的小眼虫（*Euglena gracilis*）虫种为北京大学陈阅增教授惠赠。

原细菌盐杆菌（*Halobacterium dachaidanensis*）为中国科学院微生物所田新玉先生等分离培养成功（王大珍等，1984）并提供菌种。嗜酸热硫球菌（*Sulfosphaerellus thermoacidophilum*）为中国科学院微生物所李雅芹等先生分离培养成功(钟惠芳等，1982)并提供菌种。热原质体（*Thermoplasma acidophilum*）菌种为美国马萨诸塞大学 Dennis G. Searcy 教授惠赠。作对照用的真细菌大肠杆菌为云南师范大学生命科学系所赠。

蛋白电泳与免疫印迹是依照我们多方改进过的方法(吴传芬等，1996b)，其要点如下：

（1）SDS-PAGE SDS-PAGE 以 Laemmli 的方法（Towbin 等，1979）为基础作以下修改：①浓缩胶浓度用 3%，分离胶用 5%至 12%、15%或 20%的线性梯度胶，视分离的组分而定。②样品用 Laemmli 的样品液裂解后，再加入适量的固体 SDS，沸浴加热处理 10 min 以上，视样品体积而定。③隔孔上样，以免样品互相串孔，保证转移的准确性。④电泳时用眼虫色素作为示踪剂，以其后缘走到胶板底线为终止电泳的标准。

（2）转移和印迹　以 Towbin 等人（1979）的方法为基础作下列改动：①转移用 200 mA 恒流 18 h 左右，用自来水流水浴冷却转移槽。②转移后的膜作除 SDS 处理。③封闭、一抗、二抗孵育均在 4℃冰箱内过夜进行，洗涤用的 TBS、TTBS 均事先预冷再用液。

本工作中具体所用的抗体：

mACA-2 是抗人的着丝粒蛋白 B（CENP-B）氨基末端的单克隆抗体；ra-ACA-2 是抗人着丝粒蛋白 B 的多克隆抗体 mACA-2 和 ra-ACA-2 均为美国 Johns Hopkins 医学院 William C. Earnshaw 教授惠赠。mAb37A5 是抗 CHO 细胞动粒蛋白的单抗，由加拿大 Laval 大学癌症研究中心 Ronald Hancock 教授惠赠。

FITC 标记的羊抗人 IgG 或辣根过氧化物酶标记的羊抗人 IgG，羊抗鼠 IgG 和羊抗兔 IgG 均为北京生物制品研究所和中国军事医学科学院产品。

2 结果

2.1 以抗人着丝粒蛋白 B 的单抗 mACA-2 作免疫印迹检查所得到的结果

以 m-ACA-2 作免疫印迹检查，四膜虫、眼虫、尖尾虫和典型涡鞭毛虫都有 1 条分子量 80 kD 的主带和两条分子量较大的弱反应带（吴传芬等，1996a，1996b，1996c）；贾第虫则只有 1 条 80 kD 的反应带，而没有另外两条带（图 1）。3 种原细菌和大肠杆菌则都没有反应带（图 2—5）。

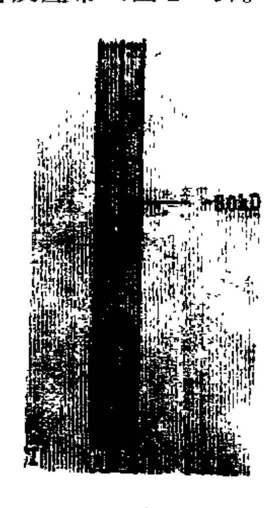


图 1 抗 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果
Fig.1 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against CENP-B
a. 贾第虫样品（*Gardia*）；
b. 小眼虫样品（*E. gracilis*）。

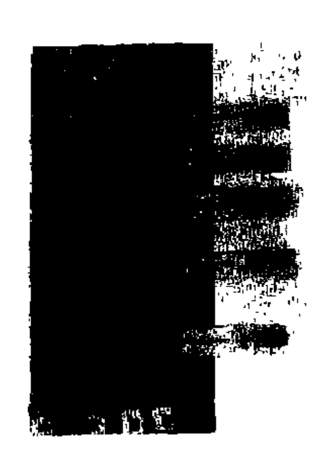


图 2 抗 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果
Fig.2 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against CENP-B
a. 盐杆菌（*H. dachaidanensis*）；b. 小眼虫样品（*E. gracilis*）；c. 标准分子量蛋白（standard proteins for identifying molecular weights）。



图 3 抗 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果
Fig.3 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against CENP-B
a. 嗜酸热硫球菌样品（*S. thermoacidophilum*）；b. 小眼虫样品（*E. gracilis*）；c. 标准分子量蛋白（standard proteins for identifying molecular weights）。

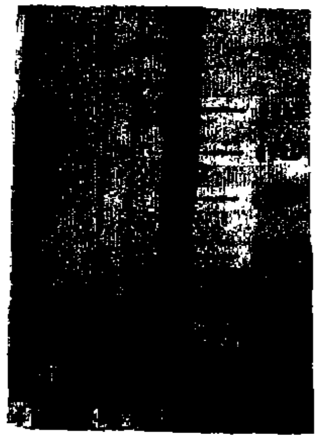


图 4 抗 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果
Fig.4 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against CENP-B
a. 热原质体样品（*T. acidophilund*）；b. 小眼虫样品（*E. gracilis*）；c. 标准分子量蛋白（standard porteins for identifying molecular weights）。

2.2 以抗人着丝粒蛋白 B 的多抗 ra-ACA-2 进行免疫印迹检验所得到的结果

用 ra-ACA-2 作检验，四膜虫、眼虫、尖尾虫与典型涡鞭毛虫都显示出分子量约 50 kD、60 kD 和 80 kD 的 3 条带（吴传芬，1996a，1996b，1996c）；贾第虫则只有分子量 80 kD 的带和分子量 60 kD 左右的带，而没有 50 kD 的带（图 6）。3 种原细菌彼此一致，也都只有 80 kD 和约 60 kD 的两条带，从而与贾第虫的情况相似。大肠杆菌则有 1 条 kD 的带和两条 80 kD 左右的带（图 9）。

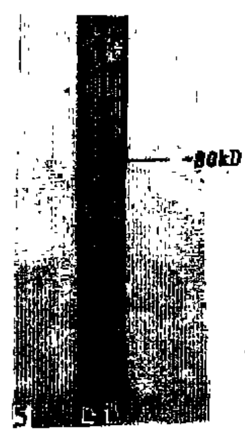


图 5 抗 CENP-B 单抗 mACA-2 的印迹结果

Fig.5 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mACA-2, against CENP-B

a. 大肠杆菌样品(*E. scherichia coli*)；

b. 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

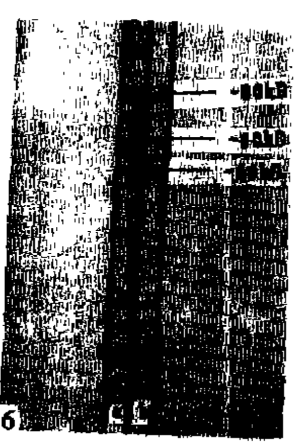


图 6 抗 CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.6 The results of immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against CENP-b

a. 贾第虫样品(*Gardia*)；

b. 小眼虫样品(*E. gracilis*)。



图 7 抗 CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.7 The results of immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against CENP-b

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)；b. 盐杆菌样品(*H. dachaidanensis*)。

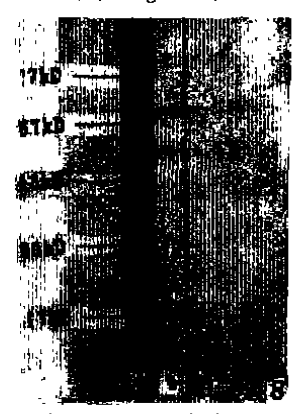


图 8 抗 CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.8 The results of immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against CENP-b

a. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)；b. 嗜酸热硫球菌样品(*S. thermoacidophilum*)。

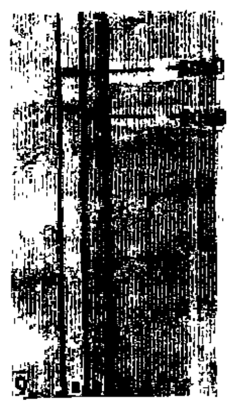


图 9 抗 CENP-B 多抗 ra-ACA-2 的印迹结果

Fig.9 The results of immuno-blotting detection by polyclonal antibody, ra-ACA-2, against CENP-b

a 大肠杆菌样品(*E. scherichia coli*)；b 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

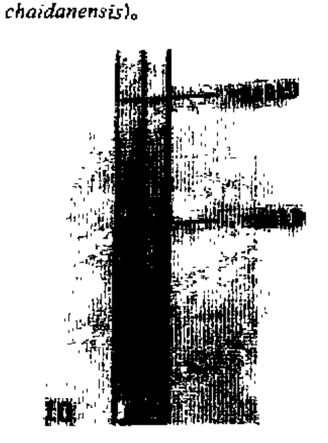


图10 抗动粒蛋白单抗 mAb37A5 的印迹结果

Fig.10 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against kinetochore protein

a. 贾第虫样品(*Gardia*)；b. 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

2.3 以抗 CHO 细胞动粒蛋白的单抗 mAb37A5 作检验所得到的结果

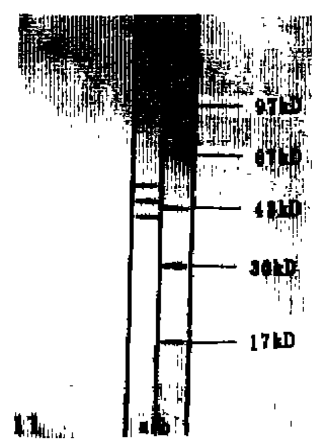


图11 抗动粒蛋白单抗mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.11 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against kinetochore protein

a 嗜酸热硫球菌样品(*S. thermocidophilum*)；b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

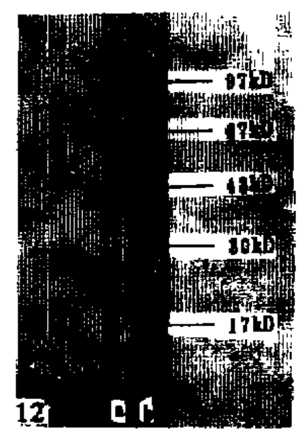


图12 抗动粒蛋白单抗mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.12 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against kineto chore protein

a 盐杆菌样品(*dachaidanensis*)；b. 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

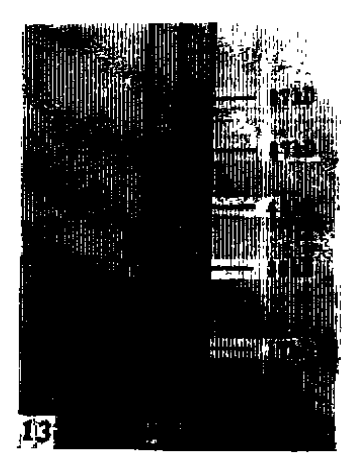


图13 抗动粒蛋白单抗mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.13 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against kineto chore protein

a 热原质体样品(T. acidophilund)；b 标准分子量蛋白(standard proteins for identifying molecular weights)。

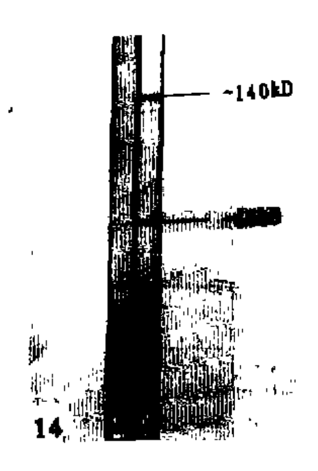


图14 抗动粒蛋白单抗mAb37A5单抗的印迹结果

Fig.14 The results of immuno-blotting detection by monoclonal antibody, mAb37A5, against kineto chore protein

a. 大肠杆菌样品(*E. scherichia coli*)；盐杆菌样品(*H. dachaidanensis*)；b 小眼虫样品(*E. gracilis*)。

以 mAb37A5 作检验所得到的结果是特别有意思的。四膜虫只有分子量约 120 kD 的 1 条反应带（吴传芬等，1996a）；眼虫和尖尾虫则有 120 kD 和 45 kD 的两条带（吴传芬

等，1996b，1996c）；典型涡鞭毛虫则除 45 kD 和 120 kD 的两条带外，还有 1 条约 50 kD 的带（吴传芬等，1996c）（图 10）。3 种原细菌则全都有 45 kD 和 50 kD 的两条带，此外还有 1 条真核生物所没有的 40 kD 左右的带（图 11—13）（热原质体此外还有 35 kD 的 1 条）。大肠杆菌则任何反应带也没有(图 14)。这些结果清楚地显出进化的线索。

3 讨论

早已有大量的多方面的分子生物学证据表明真核生物是起源于古代的某种原细菌，而决不是来自于真细菌（李靖炎，1989）。从 90 年代在产甲烷原细菌中找到了"组蛋白相关蛋白"（histone-related protein）来看，真核生物最早应该是来自于古代的一种产甲烷细菌，极可能是一种产甲烷球菌（Methanococcus）（Li Jing-yan，1995）。本工作从着丝粒／动粒蛋白的检查上为真核细胞起源于古代的原细菌的学说提供了又一个方面的新证据，首次指出各大类原细菌也都含有与真核生物的着丝粒／动粒蛋白相关的蛋白质。

在现存的真核生物中间，源真核生物是最原始的，特别是贾第虫（李靖炎，1996）。本工作从着丝粒／动粒蛋白的检查上也显示出了源真核生物贾第虫的原始性，因为与纤毛虫、眼虫、涡鞭毛虫相比，贾第虫最接近于原细菌类的相关蛋白，恰好是从原细菌到典型真核生物的一个中间过渡（表 1）。

表 1　贾第虫和其他几种原生生物以及原细菌的着丝粒／动粒蛋白的免疫电泳结果

Tab.1　Western blotting of centromere／kinetochore proteins of portists and archaebacteria

材料 \ 抗原(kD) \ 抗体	mACA-2	ra-ACA-2	mAb37A5
Human *Hep*-Ⅱ cell	80，120	50，60，80	140，160
Protozoa			
Tetrahymena thermophila	80，120	50，60，80	120
Euglena gracilis	80，120	50，60，80	45　120
Oxyrrhis marina	80，120	50，60，80	45　120
Cryptothecodinium cohnii	80，120	50，60，80	45，50，120
Archezoa			
Giardia lamblia	80	60，80	45，50，120
Archaebactna			
Halobacterium dachaidanensis		60，80	40，45，50
Thecmoplasma acidophilum		60，80	40，45，50
Sulfosphaerellus thermoacidophilum		60，80	40，45，50

从我们所得到的结果看，着丝粒蛋白 B 是极其保守的。早在真细菌从古代的原细菌分歧出来以前，着丝粒蛋白 B 就已经有分子量约 60 kD 和约 80 kD 的两种形式。这两种形式一直延续到今天的真细菌和原细菌。在真核生物从其原细菌祖先演化而来的过程中，又产生了分子量约 50 kD 的第 3 种形式。将来弄清楚了这 3 种蛋白的一级结构以后，当可知道 50 kD 的种类究竟是来自两种原始形式中的哪一种。单抗 mACA-2 所识别的是着丝粒蛋白 B 氨基端的一种基团，这种基团是原细菌和真细菌的相关蛋白都没有的，真核生物中约 50 kD 和 60 kD 的种类也都没有，是 80 kD 的种类在真核细胞的起源过程中方才得到的。至于后真核生物体内也对 mACA-2 作反应的高分子量蛋白，很可能与着丝粒蛋白实际上没有关系，只是有相似的基团而已，因为它们并不对多抗 ra-ACA-2 起反

应。

以单抗 mAb37A5 所作的检查清楚地显示出动粒蛋白的进化线索。真细菌类是原来就没有这类蛋白，还是后来失去了它们，现在还不清楚。可为这种单抗所识别的动粒蛋白，在几大类原细菌体内都只有几种低分子量的形式。其中分子量约 40 kD 的 1 种在源真核生物从其原细菌祖先进化形成的过程中就已经失去，但源真核生物却在此过程中获得了分子量约 120 kD 的 1 种。待弄清楚了两者的一级结构以后，就可知道 120 kD 的种类是否来自于 40 kD 的种类。原细菌体内的 45 kD 和 50 kD 的两种在源真核生物都仍保留着。但是进化到眼虫和尖尾虫的高度时，50 kD 的种类即消失；进化到纤毛虫的高度时，45 kD 的种类已不再存在，而只留下 120 kD 的种类。高等动物体内的高分子量的动粒蛋白也许是来自于 120 kD 的种类；但这有待将来作较深入的研究才能知道，因为高等动物并非来自于纤毛虫。

参 考 文 献

王大珍，周培瑾，田新玉等，1984. 极端嗜盐菌新种的鉴定. 微生物学报，24(4)：304—309.

李靖炎，1989. 真核细胞起源研究的进展 见：细胞生物学进展. 北京：高等教育出版社，第一卷. 185—209.

李靖炎，1996. 双滴虫与细胞核起源问题的探索. 动物学研究，17（3）：275—286.

迈尔（Magr, E.），1992. 生物学哲学. 涂长晟等译. 沈阳：辽宁教育出版社.

吴传芬，李靖炎，代嘉陵等，1996a. 涡鞭毛虫(甲藻)着丝粒／动粒蛋白的检查. 动物学研究，17（3）：307—313.

吴传芬，代嘉陵，李靖炎等，1996b. 免疫印迹技术的一些改进. 动物学研究，17（3）：315—322.

钟慧芳，陈秀珠，李雅芹等，1982. 一个嗜热嗜酸细菌的新属——硫球菌属. 微生物学报，22(1)：1—7.

Adam R D, 1991 The biology of *Giardia* sp. *Microbiol. Rev.*, 55(4): 706-732.

Cavalier-Smith T, 1987. The origin of eukaryote and archaebacteria cells. Endocytobiology Ⅲ. *Ann. of New York Academy of Sciences*, 503, 17-54

Cavalier-Smith T, 1989. Eukaryotic evolution in ⅩⅣ International Botanical Congress. Proceding, 213-223.

Li Jig-yan, 1995. Characterization of *Giardia* cell nucleus. Its implication on the nature and origin of the primitive cell nucleus. *Cell Research*, 5: 115-124.

THE RESPONSES OF ARCHEZOA AND ARCHAEBACTERIA TO THE ANTIBODIES AGAINST MAMMALIAN CENTROMERE / KINETOCHORE PROTEINS

Wu Chuanfen[①] Li Jingyan[②] Dai Jialing[③] Lu Siqi[③] Wang Yongchao[①]

(①*Dept. of Biology, Beijing Normal Univresity, Beijing*, 100875)

(②*Kunming Institute of Zoology, The Chinese Academy of Scienes*, 650223)

(③*Section of Parasitology, Capital Medical University, Beijing*, 100054)

Abstract

To understand the structure and function of the centromere / kinetochore thoroughly, we need information on its origin and evolution, since every living organization has its own origin and evolutionary history. We analyzed the protein components of the centromere / kinetochore in one archezoa, three archeabacteria and one eubacterium by western blotting with the human centromere protein B (CENP-B) monoclonal antibody, mACA-2, which recognizes the amino end region of human CENP-B; CENP-B polyclonal

antibody ra-ACA-2; and mAb37A5, a monoclonal antibody against a peptide of the kinetochore in CHO cells.

Giardia lamblia was used as a representative of archezoa, which possess no mitochondria and has 70S prokaryotic ribosomes and therefore is considered the most primitive eukaryotic cell. Three archeabacteria, *Halobacterium dachaidenesis* sp. nov. F3, *Sulfosphaerellus thermoacidophilum* S-5, and *Thermoplasma acidophilum* were used as the representatives of each existing group of archeabacteria—methanogenous-halophilic group, sulfur-dependent thermophilic group and thermoplasma group respectively. *E. coli* was used the representative of eubacteria.

On western blots using the CENP-B monoclonal antibody, mACA-2, *Giardia lamblia* reacted an 80 kD band that is similar to one of the three bands tound in other protists such as *Euglena gracilis* and *Oxyrris marina* (Wu *et al.*, 1996c). Three archeabacteria and *E. coli* gave negative response to mACA-2 antibody.

The CENP-B polyclonal antibody, ra-ACA-2, recognized similar 60 kD and 30 kD bands in *Giardia lamblia* and the three archeabacteria. The other protists tested also exhibited the two bands, and an additional 50 kD band (Wu *et al.*, 1995a-c). The reference *E. coli* gave 60 kD band and two bands about 80 kD which were different from those of either archeabacteria or giardia.

Western blots of *G. lamblia's* extracts using the kinetochore protein monoclonal antibody, mAb37A5, *Giardia lamblia* gave 45 kD, 50 kD and 120 kD bands, of which the 45 kD and 120 kD bands were also found in other tested protists (Wu *et al.*, 1994). Two archeabacteria, *Halobacterium* and *Sulfosphaerellus*, produced 40 kD, 45 kD, and 50 kD bands. Another archeabacterium *Thermoplasma* gave a 35 kD band besides those three. Eubacterium *E. coli* did not give any positive response. From the results, we can suggest a evolutionary line of mAb37A5 antigen from archeabacteria to protists: *Thermoplasma*, 35 kD, 40 kD, 45 kD and 50 kD; *Halobacterium* and *Sulfospherellus*, 40 kD, 45 kD and 50 kD; *Giardia*, 45 kD, 50 kD and 120 kD; *Euglena* and *Oxyrris*, 45 kD and 120 kD (Wu *et al.*, 1994).

Our results support the hypothesis that the eukaryotic cell evoloved from an ancient archeabacterium .and the nucleus of *Giardia* is indeed one of the most primitive of the eukaryotic nucleus. Therefore it is in the intermediate position betwen archeabacteria and eukaryotic cells. Our results suggest that although the centromere / kinetochore is a characteristic structure peculiar to eukaryotic cells, its protein molecular ancestors originated in the archeabacterial ancestor of dukaryotic cells. The differentiation of CENP-B's N-terminal structure most have occured after the archeabacterial stage.

Acknowledegements: We would like to thank Prof. Dr. Dennis G. Searcy of Univ. of Massachusetts, USA, for giving *Thermoplasma acidophilum*; Prof. Dr. William C. Earnshaw of Johns Hopkins Univ. School of Medicine, USA, for giving mACA-2 and ra-ACA-2 antibodies; Prof. Dr. Ronald Hancock of Laval Univ., Canada, for giving mAb37A5 antibody; and Prof. Dr. Laurence D. Etkin of the Department of Molecular Genetics, UTMDACC, USA, for the language. improvement of English manuscript.

Key words *Giardia lamblia*, Archaebacteria, Origin and evloution of centromere / kinetochore proteins, Immuno-blotting